

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 60-007934

(43)Date of publication of application : 16.01.1985

(51)Int.Cl.

B01J 13/02

A61K 31/60

A61K 47/00

C07K 15/00

(21)Application number : 58-118008

(71)Applicant : DAI ICHI SEIYAKU CO LTD

(22)Date of filing : 29.06.1983

(72)Inventor : HIROTA SADAO

KIKUCHI HIROSHI

## (54) PREPARATION OF LIPOSOME

## (57)Abstract:

PURPOSE: To prepare uniform liposome efficiently and in large amt. by hydrating liposome membrane composing substance by kneading it with a small amt. of aq. solvent at a temp. above the phase transfer temp. of the membrane composing substance.

CONSTITUTION: 1pt.wt. liposome membrane composing substance (e.g. phosphatidyl choline) is hydrated by kneading it with ca.0.2W8pts.wt. aq. soln. (e.g. water) at a temp. above the phase transfer temp. of the membrane composing substance. Then, necessary amt. (10W1,000pts.wt.) of aq. soln. is added to the mixture, and obtd. mixture is stirred at a temp. above the phase transfer temp. of the membrane composing substance. As a result, uniform liposome is obtd. efficiently and in a large amt.

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭60—7934

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
B 01 J 13/02  
A 61 K 31/60  
47/00  
C 07 K 15/00

識別記号

庁内整理番号  
8317—4G  
7169—4C  
7043—4C  
6464—4H

⑭ 公開 昭和60年(1985)1月16日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑮ リボソームの製造方法

⑯ 特 願 昭58—118008

⑰ 出 願 昭58(1983)6月29日

⑱ 発 明 者 広田貞雄  
東京都墨田区業平五丁目6番9  
号第一製薬中央研究所製剤研究  
センター内

⑲ 発 明 者 菊池寛

東京都墨田区業平五丁目6番9  
号第一製薬中央研究所製剤研究  
センター内

⑳ 出 願 人 第一製薬株式会社  
東京都中央区日本橋3丁目14番  
10号

明 細 書

1. 発明の名称

リボソームの製造方法

2. 特許請求の範囲

リボソーム膜成分物質を水性溶液と膜成分物質の相転移温度( $T_c$ )以上にて練合して水和させ、次に必要量の水性溶液を加えて $T_c$ 以上にて攪拌することを特徴とするリボソームの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はリボソームの製造方法に関する。

脂質の閉鎖小胞であるリボソームは、広く生体膜のモデルとしてその物理化学的諸性質の研究に利用されてきた。またリボソームはその内部に種々の薬剤を保持することが可能であるために、マイクロカプセルの一種として難経口吸収性薬剤の吸収促進、抗癌剤等の細網内皮系組織へのターゲッティング、免疫賦活剤等の活性増強等の応用研究が数多くなされている。リボソームがこれらの研究に盛んに用いられている

主な理由は、リボソームの膜構成成分自体が生体由来の脂質であるために毒性が少ないこと、生体の種々の膜との親和性が高いことなどが挙げられる。一方これらリボソームの調製法としては大部分膜成分物質である脂質の溶解剤としてクロロホルム、エーテル、ベンゼン、エタノール、ヘキサン等を用いており、また脂質の可溶化剤としてコール酸、トライトン X-100 及びその他の界面活性剤を用いている。従って前者の場合には有機溶媒を減圧、加温、不活性ガスのバブリング等により除去せねばならないし、最終製品中の残留溶媒が問題となる。またこれら調製方法をそのまま工業的生産に結びつけるには保安上及び安全作業上の問題の他、操作技術上の困難さ等がある。更に後者の場合には最終製品から透析またはゲル濾過によって用いた界面活性剤を分離除去する必要がある。

有機溶媒あるいは界面活性剤等を用いずにリボソームを調製するものとしては、アニーリング法、凍結融解法の他、特開昭57-82310

号及び同57-82311号に示される凍結乾燥法などがある。アニーリング法では、リン脂質-水分散液をリン脂質の相転移温度( $T_c$ )以下にて超音波照射し、構造欠損(structural defect)を起こしたSUV(小さな一枚膜リボソーム)をいったん製し、その後に $T_c$ 以上でインキュベーションして融合させLUV(大きな一枚膜リボソーム)を調製する手法をとっている。凍結融解法では、大豆リン脂質に緩衝液を加え20～35℃で20分間超音波照射してSUVをいったん製し、次にドライアイス-エタノールですばやく凍結し、更に室温に戻して融解させ、30℃で軽く超音波照射して融合させることによりLUVを調製する手法をとっている。また凍結乾燥法ではリン脂質を水性溶媒中に分散させた後凍結乾燥し、これを水性溶媒中に再分散させることによりリボソームを製するものである。しかしながら、これ等の方法は再現性、装置及び操作上工業的製法として必ずしも満足しうるものではない。

は、例えばホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン等に代表されるリン脂質の他糖脂質、ジアルキル型合成界面活性剤等の一種又は二種以上の混合物が主体となる。なお、これに膜安定化剤としてコレステロール、コレスタン等のステロール類を、荷電物質としてジセチルホスフェート、ホスファチジン酸、ガングリオシド、ステアリルアミン等を、更に酸化防止剤として $\alpha$ -トコフェロール等を加えて膜成分物質を形成させてもよい。これらリボソームの膜成分物質の比率は何ら限定されるべきものではないが、好ましくは脂質1重量部に対しステロール類を0～2重量部程度、荷電物質を0.1重量部程度加えるのが適している。

また膜成分物質を分散させる水性溶媒としては、水、生理食塩水、緩衝液、糖類の水溶液及びこれらの混合液等が好ましく使用される。膜

発明者らはこれらの状況に鑑み、従来その有用性についてはあまり顧みられなかった有機溶媒を全く使用せずにリボソームを製する方法、即ちただ単に脂質を水性溶媒中に分散させる方法に注目し、その改良について鋭意検討した結果、リボソームを構成する通常の膜成分物質をまず少量の水性溶媒とともに膜成分物質の相転移温度( $T_c$ )以上にて練合して充分に水和させ次に必要量の水性溶媒を加えて $T_c$ 以上にて攪拌することにより、均一なリボソームを効率良くしかも大量に製することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は膜成分物質を少量の水性溶媒とともに機械的に練合するため、水和が非常にすみやかに起こり、従って次に水性溶液を加えて $T_c$ 以上にて攪拌すると、膜成分物質はすでにラメラ相(2分子膜)状態であるため容易に閉鎖小胞を形成していくことになることを見出したことに起因する。

本発明において使用される膜成分物質として

成分物質との使用比率は膜成分物質1重量部に対し、始めの練合では0.2～8重量部程度、次の攪拌では10～1000重量部程度が適している。

本発明のリボソームに保持させる薬剤としては特に制限はないが、サイトシンアラビノシド、メトトレキサートに代表される制癌剤、ペニシリンGに代表される抗生物質、インシュリン、インターフェロン、グルコアミラーゼに代表されるたんぱく質、デキストランに代表される多糖類、DNA、RNAの如き核酸類、ビタミンAに代表されるビタミン類などの他サリチル酸ナトリウムのような一般薬剤が用いられ、一般にはこれ等は水性溶媒に溶解して用いる。

本発明にもとづいてリボソーム製剤を製するには以下の如き手順によれば良い。

まず所定量の膜成分物質をとり、これに少量の水性溶媒を加えて膜成分物質の $T_c$ 以上にてよく練合する。この時添加順序は何ら限定はされないが、本発明ではこの練合操作により膜成

分物質を充分水和させてラメラ構造(2分子膜)を生成させることに主眼があり、この練合は充分に行う必要がある。練合する方法としては、乳鉢、ホモジナイザー、ニーダー等通常の練合に用いる装置を用いれば良い。またこの練合操作による膜成分物質の水和は、膜成分物質の粉末結晶としての相転移温度( $T_c$ )以上に行えば更に効率が良い。なおこの練合による水和の段階では、もしこの少量の水溶性溶媒中に薬剤を溶解せしめることが可能ならばその一部もしくは全てを溶解せしめてから膜成分物質との練合操作に入っても良い。

かくして得られた膜成分物質等の充分に水和された生成物はそのまま回収して窒素置換等の処理を施し、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下に保存しても良いし、次の操作、即ち水性溶媒を加えて $T_c$ 以上に攪拌する操作を行っても良い。

この攪拌においては、攪拌機の種類によりできるリボソームの粒径は影響を受けやすい。即ち、プロベラミキサーの如く比較的緩和な攪拌

機を用いた場合には大きな粒径のリボソームができやすいし、ホモミキサーの如く比較的せん断力の強い攪拌機を用いた場合には小さな粒径のリボソームができやすい。また更に小さな粒径のリボソームを製するには超音波乳化機、高圧乳化機等を用いるのも良いし、径を均一にするため限外濾過膜法、例えばポリカーボネート製メンブラン・フィルターによって粒径分布をコントロールすることも可能である。

なお同一処方内で薬剤のリボソームへの保持率を高めるには、保持させる薬剤を始めの膜成分物質との練合に用いる水性溶媒中にその一部もしくは全てを溶解せしめるか、あるいは次の攪拌に用いる水性溶媒の一部に薬剤を溶解せしめ、これでまずリボソームを調製したのち残りの水性溶媒を加えて希釈すればよい。

このようにして薬剤を保持した均一粒径のリボソーム製剤が再現性良くしかも大量に得ることもできるが、このリボソーム製剤はこのまま使用しても良く、また透析、ゲル濾過、遠心分

離等の手段によりリボソームに保持されなかった薬剤を分離除去して使用しても良い。

既知のリボソーム調製法に比して本発明法が優れているところは次の点である。

- 1) 有機溶媒をいっさい使わずにリボソームの調製が可能である。従って保安上、安全作業上及び生物学的安全性上問題ない。
- 2) 製造は非常に簡便で、特別な装置や操作技術は必要としない。調製時の温度制御に留意するのみで良い。
- 3) 薬剤の保持率の高いリボソーム製剤が得られる。
- 4) スケールアップが容易であり、リボソーム製剤の工業的生産が可能である。
- 5) はほとんど全ての脂質で調製可能である。

次に実施例により本発明を例示するが、これらの実施例は何ら本発明を限定するものではない。

#### 実施例 1

市販の L- $\alpha$ -ジミリスチルホスファチジ

ルコリン(L- $\alpha$ -DMPC, 純度98%,  $T_c=23^{\circ}\text{C}$ )を0.7gとり、 $30^{\circ}\text{C}$ 恒温室内であらかじめ $30^{\circ}\text{C}$ に保温した0.28Mグルコース水溶液1mlを加え充分に練合した。この操作を更に3回(即ち練合に用いた水性溶媒量は4ml)繰り返しリン脂質を充分に水和せしめた。

次にあらかじめ $30^{\circ}\text{C}$ に保温した0.28Mグルコース水溶液4.6mlを加え攪拌した。この液をホモミキサーにより2分間攪拌し(ここまでは全て $30^{\circ}\text{C}$ 恒温室内)、室温に戻したところグルコースを保持した乳白色のリボソーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液0.5mlをとりセファデックスG-50を用いてゲル濾過(1cm $\phi$ ×18cm, 生理食塩水,  $5^{\circ}\text{C}$ )し、リボソームに保持されなかったグルコースを分離除去した。次いでリボソーム画分のグルコースを常法に従って油/水分配により水層中に抽出し定量したところ、保持率は13.5%であった。

またゲル濾過して得たリボソーム画分を光学

顕微鏡（日本光学，広視野顕微鏡）により観察したところ，粒径1～数 $\mu\text{m}$ の均一な球状を呈していた。

#### 実施例 2

市販のL- $\alpha$ -ジバルミトイルホスファチジルコリン（L- $\alpha$ -DPPC，純度98%， $T_c=41^\circ\text{C}$ ）1.0gをとり， $40^\circ\text{C}$ 恒温室内であらかじめ $40^\circ\text{C}$ に保温した生理食塩水3mlを加え充分に練合し水和せしめた。尚このとき試料には温風をあて試料温度が $45^\circ\text{C}$ 前後となるようにして行った。

次に室温にて上記生成物にあらかじめ $45^\circ\text{C}$ に保温した0.28Mグルコース水溶液4.7mlを加えた後， $40\sim 45^\circ\text{C}$ にてホモキサーにより2分間攪拌し室温に戻したところ，グルコースを保持した乳白色のリボソーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液0.5mlをとり実施例1と同様にゲル濾過（ただし室温）を行ったところ，その保持率は14.8%であった。

#### 実施例 4

市販のDL- $\alpha$ -ジバルミトイルホスファチジルコリン（DL- $\alpha$ -DPPC，純度99%， $T_c=41^\circ\text{C}$ ）0.7g及びジセチルホスフェート（DCP）55mgをとり，あらかじめ $75^\circ\text{C}$ に保温した生理食塩水4mlを加え充分に練合し水和せしめた。尚このとき試料には温風をあて試料温度が $70\sim 75^\circ\text{C}$ となるようにして行った。

次に上記生成物にあらかじめ $50^\circ\text{C}$ に保温した0.5%サリチル酸ナトリウム生理食塩水溶液4.6mlを加えた後， $45\sim 50^\circ\text{C}$ にてホモキサーにより2分間攪拌し室温に戻したところ，サリチル酸ナトリウムを保持した乳白色のリボソーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液0.5mlをとり，実施例2と同様にゲル濾過を行ったところ，その保持率は12.1%であった。

#### 実施例 5

完全水添精製卵黄レシチン（IV-1，リン脂質99%以上， $T_c=45\sim 60^\circ\text{C}$ ， $T_{\text{max}}=52^\circ\text{C}$ ）

またゲル濾過して得たリボソーム画分を広視野光学顕微鏡により観察したところ，粒径 $1\mu\text{m}$ 前後の均一な粒状を呈していた。

#### 実施例 3

市販のスフィンゴミエリン（SM， $T_c=32^\circ\text{C}$ ）1.0g及びステアリルアミン（SA，シグマ）40mgに $40^\circ\text{C}$ 恒温室内であらかじめ $40^\circ\text{C}$ 前後に保温した0.28Mグルコース水溶液4mlを加え充分に練合し水和せしめた。

次にあらかじめ $40^\circ\text{C}$ に保温した0.28Mグルコース水溶液4.6mlを加え， $40^\circ\text{C}$ 恒温室内で実施例1と同様にホモキサーにより2分間攪拌した後室温に戻したところ，グルコースを保持した乳白色のリボソーム懸濁液<sup>が</sup>得られた。

このリボソーム懸濁液0.5mlをとり，実施例2と同様にゲル濾過を行ったところ，その保持率は20.0%であった。

またゲル濾過して得たリボソーム画分を広視野光学顕微鏡により観察したところ，粒径1～数 $\mu\text{m}$ の均一な粒状を呈していた。

1.1.0g及びDCP820mgを乳鉢にとり，あらかじめ $75^\circ\text{C}$ に保温した0.5%サリチル酸ナトリウム生理食塩水溶液40mlを加え，実施例4と同様に $70\sim 75^\circ\text{C}$ にて充分に練合し水和せしめた。

次に上記生成物にあらかじめ $60^\circ\text{C}$ に保温した0.5%サリチル酸ナトリウム生理食塩水溶液2.60mlを加えた後， $55\sim 60^\circ\text{C}$ にてホモキサーにより3分間攪拌し室温に戻したところ，サリチル酸ナトリウムを保持した乳白色のリボソーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液0.5mlをとり，実施例2と同様にゲル濾過を行ったところ，その保持率は26.6%であった。

#### 実施例 6

実施例5と同様にして完全水添精製卵黄レシチン1.1.0g及びDCP820mgをとり，あらかじめ $75^\circ\text{C}$ に保温した生理食塩水40mlを加え $70\sim 75^\circ\text{C}$ にて充分に練合し水和せしめた。

次に上記生成物にあらかじめ $60^\circ\text{C}$ に保温し

た1%デキストランT40生理食塩水溶液  
260mlを加えた後、55～60℃にてプロベ  
ラミキサーにより8分間攪拌し室温に戻したと  
ころ、デキストランT40を保持した乳白色の  
リボソーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液1mlをとりセファロー  
ズOL-4Bを用いてゲル濾過(2.2cmφ×  
42cm, 生理食塩水)し、リボソームに保持さ  
れなかったデキストランT40を分離除去した。  
次いでリボソーム画分のデキストランT40を  
常法に従って、油/水分配により水層中に抽出  
し定量したところ、保持率は15.7%であった。  
実施例7

実施例6と同一の処方で行ったが、デキスト  
ランT40は高濃度生理食塩水溶液で添加し、  
この段階で攪拌してリボソームを調製し、その  
後残りの生理食塩水を加えて希釈、攪拌した。  
即ち実施例6と同様にまず完全水添精製卵黄レ  
シチン11.0g及びDCP820mgをとり、あ  
らかじめ75℃に保温した生理食塩水40mlを

加え70～75℃にて充分に練合し水和せしめ  
た。

次に上記生成物にあらかじめ60℃に保温し  
た2%デキストランT40生理食塩水溶液  
180mlを加えた後、55～60℃にてプロベ  
ラミキサーにより8分間攪拌した。この液を室  
温に戻した後、更に生理食塩水180mlを加え  
て室温にてプロベラミキサーにより2分間攪拌  
したところ、デキストランT40を保持した乳  
白色のリボソーム懸濁液が得られた。

このリボソーム懸濁液1mlをとり、実施例6  
と同様にゲル濾過を行ったところ、その保持率  
は24.1%であった。